

intracellularly generates reactive oxygen species involved in apoptosis and cell proliferation.

Free Rad Biol Med, 30(3):248-259, 2001.

3) Yamashita K, Arai T, Fukuda K, Mori H, Ishii H, Nishioka M, Tajima K, Makino K, Sasada M: 6-formylpterin intracellularly generates hydrogen peroxide and restores the impaired bactericidal activity of human neutrophils. Biochem Phys Res Commun, 289(1):85-90, 2001.

2. 学会発表

1) 小林進, 山下浩平, 高橋淳, 大月哲也, 山本孝吉, 内山卓, 笹田昌孝: 慢性好中球性白血病における好中球アポトーシス遅延の分子機構. 第63回日本血液学会総会, 2001.4.19-21, 名古屋, Int J Hematol, 73(Suppl 1):130, 2001.

2) 宮原裕子, 山下浩平, 高橋淳, 小林進, 山本孝吉, 内山卓, 笹田昌孝: GM-CSFによるヒト好中球アポトーシス抑制機構. 第63回日本血液学会総会, 2001.4.19-21, 名古屋, Int J Hematol, 73(Suppl 1):144, 2001.

3) 笹田昌孝: 好中球の新しい量的・質的異常とその検査. 第2回日本検査血液学会 教育講演, 2001.7.14-15, 大阪. 日本検査血液学会雑誌, 3(1):1-6, 2002.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

難治性血管炎に伴う多臓器不全に係わる病態の解明および治療法の開発に関する研究：
多臓器不全の発症機構における T 細胞抗原受容体（TCR）多様性からの
T 細胞の分子生物学的検討

分担研究者 木村 暢宏 福岡大学病院 講師

研究要旨：

多臓器不全に係わる病態解明を、免疫機能不全の角度から検討した。遺伝性疾患の家族性血球貪食症候群(FHL)の殆どや劇症肝炎では、本来のT細胞が有するT細胞抗原受容体(TCR)多様性の欠如、また複数のT細胞クローンなどによる免疫不全状態が共通して存在することが明らかとなった。また、更なる検討のために、新たに機能的 $\alpha\beta$ -T細胞クローンを微量レベルで追跡できる方法を開発した。

A. 研究目的

免疫の立湯から、肝臓をはじめ多臓器の機能不全機能異常あるいは臓器障害の劇症化の早期診断と劇症化への移行を克服するための病態解明と治療法の開発をめざす。多臓器不全の発症機構の解明として、免疫系の異常を(1)サイトカイン系の機能不全、(2)免疫系の機能不全、(3)遺伝性疾患や感染により誘発される疾患の病態などを解析する。

多臓器不全をきたす代表的遺伝性疾患の家族性血球貪食症候群(FHL)や劇症肝炎を含む肝炎後再生不良性貧血症例について、末梢血中に最も多く存在する $\alpha\beta$ -T細胞のTCRを遺伝子レベルで検討し、T細胞が本来もつTCR多様性やクローンの出現の有無につき検討する。さらに、詳細な検討のため、 $\alpha\beta$ -T細胞の微量レベルを半定量化できるシステムを確立することを目的とする。この方法を用いれば、機能的異常T細胞クローンを臨床病態とあわせて追跡できるようになる。

B. 研究方法

1. 患者由来細胞と株細胞：臨床各病期に患者より末梢血(PB)や骨髓液(BM)を採取し、フィコールによる比重遠心法にて単核細胞群(MN)を分離回収し、RNAを抽出した。半定量化システムを開発するために、試験管内の $\alpha\beta$ -T細胞株であるJurkat細胞、MOLT4細胞を用いた。
2. TCRVレパートリーの解析：我々の開発した簡略化inverse PCR法をもちいて、サンプルRNAをcDNAとし、さらにligationし、それぞれ2種類のプライマーを用いてPCRを行い、TCR α 鎖や β 鎖の未知の割合の可変部(V)領域を均等に増幅。Vを含む一部の遺伝子産物を32p-dCTPでラベルし、20種類のヒトV β 遺伝子やV α 遺伝子が敷かれたフィルター上でプロットを行う。濃度を濃度測定器で計測し各Vレパートリーを%で表現した。
3. 高頻度V β レパートリーのJ β 遺伝子を13種類のプライマーを用いてV-J β PCR解析を行った。
4. TCRのPCR増幅産物のCDR3領域単一性あるいはクローン性を検討するためにSSCP法によりバ

ンドの有無を検討した。

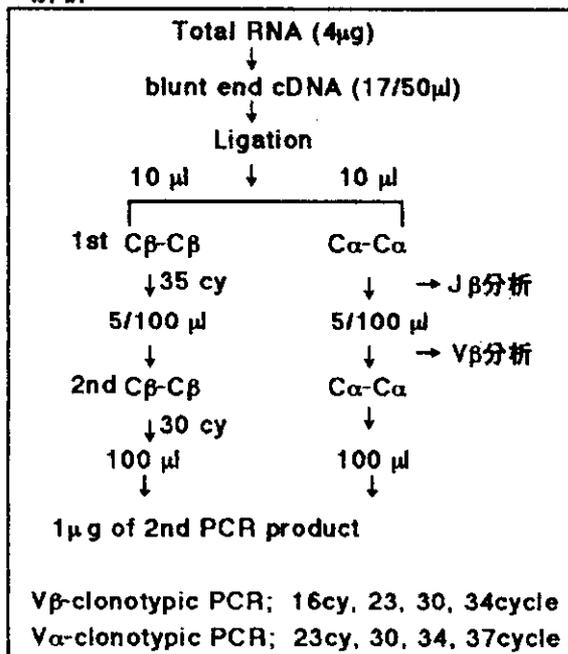
5. SSCP 法によりバンドを認めた場合、TCR の direct sequencing により CDR3 領域の塩基配列を決定し、T 細胞の TCR clone の特異的 clone typic primer) を作成した。

6. T 細胞性白血病患者の各臨床病期(発症と寛解)での末梢血を採取。希釈法による半定量的検討でクローン微小残存細胞量を算定する。

7. (倫理面への配慮)

TCR 遺伝子を解析する対策として患者からのインフォームド・コンセントを得る。骨髓・末梢血よりリンパ球細胞分画を採取し、T リンパ球が細胞性免疫として働く T 細胞抗原受容体 (T-cell receptor, TCR) 遺伝子の発現状態を分析することで、特定のクラスの T リンパ球の増減が病態に影響しているかどうかを研究する理由を説明する。この研究への参加は自由で、参加しなくても不利益は受けないこと。プライバシーや医療記録は守秘されること。決して、本人や家族・血縁者に損害が及ぶことがないことを制約、成績の公表前であればいつでも参加を取り下げる事ができること。また、今後この疾患と関わる遺伝子が判明した場合、TCR 遺伝子以外の遺伝子を研究することがある事などを記載した同意文書を作成し、同意文書に自署による署名を得る。

簡略 Inverse RT-PCR法と微小残存病変解析



既提供試料で同意が与えられていなかったものは、今回の同意文書に承認されたもののみを使用する。既提供試料で患者自身が死亡している場合は、倫理委員会の承認を得られた場合に限り使用する。

C. 研究結果

1. 血球貪食症候群は、発熱・汎血球減少を生じ、しばしばそれら修復・恒常性にかかわる機構の破綻は‘激症’となって修復不能状態への悪循環に陥るものと思われる。この本質は活性化 T 細胞による高サイトカインによるマクロファージ・組織球活性化に起因とされている。

遺伝性疾患の家族性血球貪食症候群 (FHL) で T 細胞における著しく偏った限定された TCR レパートリーやオリゴクローン T 細胞の存在を証明した (Nagano M, Kimura N 1998)。この FHL は予後不良で骨髓移植以外助かる道はなく、その病態は免疫不全状態から生じている。化学療法やアロ造血幹細胞移植による寛解状態では、T 細胞における TCR の多様性は改善し、増悪時のクローン T 細胞も消退している (Kimura N, 2001)。日本における FHL 症例では、一部パーフォリン遺伝子異常とグランザイム発現異常例が半数、残りの半数は不明の遺伝子異常と考えられた。これらサブ分類と TCR 多様性パターン・オリゴクローン T 細胞の特徴は一致した (論文準備中)。

Three pattern of TCR analysis in 8 Japanese FHL patients

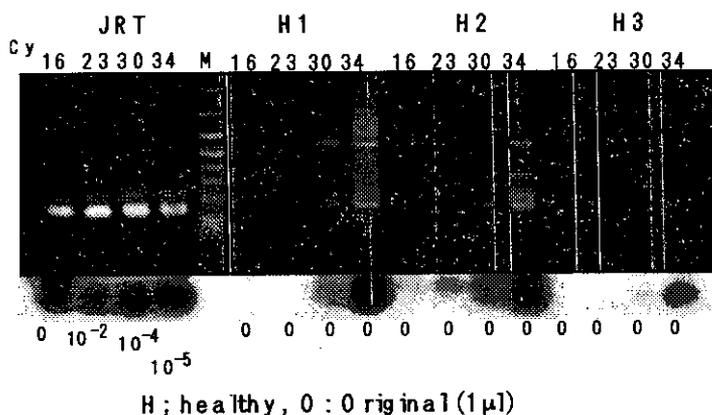
Pt	Pathogenesis	J _β bias in pan αβ ⁺ -T cells	Clonality restricted TCR
1	unknown	J _β 1	Oligo- +
2	unknown	J _β 1	Oligo- +
3	unknown	J _β 1	Oligo- +
4	unknown	J _β 1	Oligo- +
5	granzyme	J _β 2	Oligo- +
6	granzyme	J _β 2	Oligo- +
7	perforin	—	Mono- —
8	perforin	—	? —

2. 4例の肝炎後再生不良性貧血（うち劇症肝炎1例）の発症時と治療後寛解時の臨床病期においてTリンパ球クローンを検討し、発症時T細胞クローンの増加、免疫抑制剤療法後の改善時そのクローンの減少・消退を確認した。また、多臓器不全に陥るとされる劇症肝炎例において他の例より高度のT細胞のTCR多様性の欠如を認めている。

3. これまでに、機能的 $\alpha\beta$ -T細胞クローンを微量レベルで追跡できる方法は報告されていない。 $\alpha\beta$ -T細胞クローンを微量残存病変（MRD）でも追跡できる方法を開発した。

$\alpha\beta$ -T細胞 cell lines (JRT)における特異的V β C bnotypic PCRの感度

JRT : V β 8 (sense), c bnotypic antisense



104~106個に1個の細胞レベルまで確認でき、ATLなどの $\alpha\beta$ -T細胞腫瘍は勿論のこと、反応性・機能的T細胞（HLA拘束性CTLなど）クローンを実際の患者の臨床病態において追跡できるものと思われた。さらに機能的T細胞ではreal time PCR法の開発も可能となる。

D. 考察

先天性・2次性疾患において多臓器不全状態では、Tリンパ球のTCR多様性が欠如している免疫不全状態にあって、これらバランスの崩れが高サイトカインを導いていることが示唆された。先天性の場合、免疫抑制療法は一時的寛解をもたらすがやがて再発する。治癒をもたらす最善療法は唯一アロ造血幹細胞移植と思われた。今後、重症

複合免疫不全症（SCID）、ウイルス関連血球貪食症候群（VAHS）、慢性活性EBV感染症などの症例に広げて同様なTCR多様性欠如やオリゴクローンT細胞が存在するかを検討する。また、その免疫コントロールにNKT細胞の関与があるかどうか発症機序の一端を解明し、新しい治療法の開発をめざす。

E. 結論

1. 多臓器不全をきたす代表的疾患の家族性血球貪食症候群（FHL）の殆どや劇症肝炎症例では、病態増悪時にTCR多様性の欠如、また複数のT細胞オリゴクローンなどによる免疫不全状態が共通して存在することが明らかとなった。また、回復時、正常パターンを示した。
2. 機能的 $\alpha\beta$ -T細胞クローンを微量病変レベルで追跡できる半定量法を開発した。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Effect of chemo therapy and stem cell transplantation in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis analyzed by T-cell repertoire. Kimura N, Ishii E, Sato M, Yoshida T, Nagano M, Takeda H, Imashuku S, Tamura K. BrJHaematology 113(3): 822-831, 2001.
 - 2) Oligoclonal $\alpha\beta$ -T cells in Epstein-Barr virus associated hemophagocytic lymphohistiocytosis with abnormal karyotype(s). Ishii E, Kimura N, Honda K, Eguchi M, Nakayama H, Tanaka M, Ichinose I, Yoshida T, Tamura K. cancer Genet Cyto 129: 69-75, 2001
 - 3) characterization of novel natural killer (NK)-cell and $\gamma\delta$ T-cell lines established from primary lesions of nasal T/NK cell lymphoma associated with the Epstein-Barr virus.

Nagata H, Kanno A, Kimura N, Zhang Y, Kimura M, Demachi A, Sekine T, Yamamoto K, Shimizu N.

Bblood 97 : 708-713, 2001.

2. 学会発表

- 1). EBV 関連血球貪食症候群 (EBV-HLH) における oligoclonal T 細胞 石井栄一、木村暢宏、他 5 人
第 63 回日本血液学会 (於名古屋) 平成 13 年 4 月 19 日-21 日
- 2). FHL の J β 2 に偏ったオリゴクローナリティー 木村暢宏、他 4 人
第 63 回日本血液学会 (於名古屋) 平成 13 年 4 月 19 日-21 日
- 3). New classification of primary HLH based on immunological and biological analysis. Ishii E, Kimura N, et 6 persons. The 17 annual meeting of the histiocyte society (Stresa, Italy, Sep 10-12, 2001)
- 4). TCR V β N α レパートリーからの ATL 微少残存病変の半定量法の確立. 木村暢宏、他 10 人
第 43 回日本臨床血液学会 (於神戸) 平成 13 年

11 月 13 日-15 日

5). TCR 解析による原発性血球貪食症候群 (FHL) の新分類. 石井栄一、木村暢宏、他 3 人

第 43 回日本臨床血液学会 (於神戸) 平成 13 年 11 月 13 日-15 日

6). Mantle cell lymphoma (MCL) の T 細胞レパートリーの解析. 加藤光次、木村暢宏、他 10 人

第 43 回日本臨床血液学会 (於神戸) 平成 13 年 11

月 13 日-15 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記なし。
2. 実用新案登録
特記なし。
3. その他
特記なし。

厚生科学研究補助金 分担研究報告

高速度高感度ビデオシステムを用いた微小循環研究

1. 多臓器不全における血小板凝集能測定の基礎的研究

分担研究者 関塚永一 国立埼玉病院臨床研究部長

研究要旨

血小板凝集能における検査方法として、透過率により凝集能を評価する濁度法が臨床的にも多く用いられてきた。しかし透過率による評価では、透過光の検出感度低下による低濃度惹起の微小凝集における塊検出感度の低下が報告されている。それゆえに、臨床や臨床検査面におけるより有効な血小板凝集能評価法が求められている。この検出感度における問題点を改善すべく開発された装置が、散乱光を用いた血小板凝集能測定装置である。我々は、同装置における装置理論を明確にし、Polystyren Microsphere を用いた実験と顕微鏡画像における装置データとの相関により、この装置における有用性を検討することを本研究の目的とした。Polystyren Microsphere は、均一粒子径を持つ微小ビーズで、この粒子を用いる事で任意の大きさを作成できない血小板と異なり、既知の大きさの粒子を用いる事ができる。これにより、一定の散乱光強度を検出する事ができるメリットを持つ。以上の実験により装置における検出感度の検出有用性が確認する事ができ、また装置理論における考察からも装置の有用性を確認する事ができ、多臓器不全における血小板凝集能測定の基礎的研究を行なった。

A. 研究背景および目的

以前から、血小板凝集能測定法は、幅広く行なわれてきた。その典型的な例が、透過光を用いて血小板凝集能を検査する濁度法である。この方法は、試料内に満たされた血小板浮遊液(多血小板血漿:PRP)に光を照射して、それより得られた透過率を測定することで、凝集能を検討しようというものである。しかし、透過率の変化が生じるのが、比較的大きな凝集塊が生じてからであるために微小凝集塊における検出感度が低下するという欠点がある。また、実際に生体内では、PRP で大凝集塊を形成させるような強い血小板凝集惹起物質は放出されることは少ない事からも微小凝集塊における検出感度の向上が求められる。そこで濁度法の欠点を改善すべく開発された装置が、散乱光を用いた血小板凝集能測定装置(PA-200,KOWA)である。

我々は、臨床においても使用されている同装置の有用性を、装置の構造を明確化し、検出感度を基礎実験により検討することを研究目的とした。

B. 実験方法

1. 装置概略図および装置理論

血小板凝集能測定装置(Platelet Aggregation Analyzer, PA-200, 興和オプテメド株式会社)の概略図を示す。レーザー光には半導体レーザー波長 675nm の近赤外光を用いている。そして集光レンズを用いて、照射径は約 40 μ m 程度にまで絞られ試料に照射される。

試料は、専用の直径 7mm で高さ 50mm の円柱状のガラス容器(キュベット)に入れて実験を行なう。キュベットはインキュベーターを用いて生体内と条件が等しくなるように 37°C ($\pm 0.5^\circ$ C) に保温されて

いる。またキュベット内には金属スターラーが入っており、1000rpm で回転している。この回転速度は、ずり応力としては作用しない速度で、ただ攪拌のみを目的としており、濁度法においても用いられている攪拌速度である

またレーザービーム上の限られた範囲の散乱

レーザー光はキュベット外径 7mm の内壁より約 1mm の近傍に極小測定領域 $20 \times 60 \times 140 \mu\text{m}$ を 2 つ想定し照射され、そこからの散乱光を検出する仕組みになっている。キュベットの内壁より約 1mm の近傍というのは、周囲に存在する測定粒子以外の多重散乱を避けるためである。これについての議論は、後述に譲る。また 2 つの測定領域より検出された散乱

2. 測定データ

測定データには、Fig4 の様なデジタル変換される前のアナログデータを評価してデータの解析が行われている。試料を入れ、測定を開始してから 10 分間のデータの採取が可能である。散乱光強度は、 $100 \mu\text{sec}$ 毎に検出されており、時間分解能としては妥当であると考えられる。また解析データは Fig4 に示すように、散乱光強度を任意に決定可能な 2 つの閾値によって分けることにより小凝集を S・中凝集を M・大凝集を L として最大 3 つに分けることが可能である。更に分けられた 3 つの領域内に存在する散乱光強度のピークを合計することで各々の領域を比較評価する。実際に同装置から得られる画像を Fig5 に示した。このグラフは、各領域内の検出散乱光強度において

光を顕微鏡の光学系を用いて検出することで、検出感度を向上させている。その散乱光を電圧としてフォトダイオードアレイを用いて検出し、それを AD 変換して、パソコン上にデータを取り込み、形成された凝集塊の大きさ・数を表示している。

光は、2 つのフォトダイオードにおいて差動増幅器を用いてプラスとマイナスで検出され、ノイズをカットした後に、絶対値回路によりその絶対値のみを、絶対値回路によりその絶対値のみを評価に用いている。以上のような散乱光の検出方法は、Fig.2 に示した様に、入射光の光軸に対して 90° 方向の散乱光を検出している。Fig.2 にその詳細なイメージ図を示す。

10 秒間の平均を 5 秒間隔ですらして平均を取った値をプロットして作られたグラフである。また、右側のグラフは各領域内に存在する散乱光強度のピークを数えプロットしたものである。

3. 閾値の定義

この装置における閾値は、散乱光強度(mV)の常用対数で取った際に等間隔になるように設定したもので、1 ~ 32 まで設定されている。(Fig.6, Fig.7)散乱光強度が粒子径の 2 乗に比例する事を考えれば、閾値は計測する凝集塊の大きさの指標となることがわかる。更に Fig4 に示されている様に、単一血小板やノイズを意味する微小な散乱光強度を切り捨てる設定になっている。

III 装置の有用性検討のための基礎実験

1. 装置における検出感度の検討

濁度法を用いた凝集能測定装置の欠点を改善すべく開発されたものが、散乱光を用いた血小板凝集能測定装置である。しかし、その検出精度については、詳細に言及されているものは少ない。そこで本研究では、装置の検出感度を検討することを研究目的とした。

2. 実験で用いた試料

基礎実験は、血小板と散乱傾向が類似しており、かつ粒子径誤差の少ない特徴を持つ球状の微小ビーズ Polystyren Microsphere(sigma) (以下マイクロビーズ) を使用した。実験に用いたマイクロビーズ径は、1,3,6,10,20 μm の5種類である。このマイクロビーズを任意に濃度調整した後に実験で用いた。マイクロビーズは、鏡面的な性質を持ち血小板よりも得られる散乱光強度が非常に強い欠点を持つ。しかし血小板凝集塊の様に大きさにばらつきがないため、基礎実験には適しており、理論的には得られる散乱光強度も一定に検出されるメリットを持つ。

3. 濃度の調整

濃度の調整は、以下の様に導く事ができる。

マイクロビーズ径 $R(\mu\text{m})$

ポリマー密度 $p(\text{g/ml})$ * $p=1.05$

ラテックス中のポリマー $W(\text{g/ml})$

とおくと、

ビーズの体積は、

$$\pi R^3/6 (\mu^3\text{m}^3) = \pi R^3/6 \times 10^{-12}(\text{ml})$$

とおける。

するとラテックス 1ml 中のポリマーの重さが $W(\text{g/ml})$ が既知なので、1ml 中のビーズの個数を求める事ができるので、

$$(6W \times 10^{-12})/p \pi R^3 (\text{個/ml})$$

と濃度を表す事ができる。この式を用いて、

任意の濃度を調整した。

マイクロビーズを実験試料として用いるためには、単独で検出することが可能である適当な濃度に調整する必要がある。濃度が低いと測定領域内に入る確率も低くなり、一定の強度検出が困難になる。逆に濃度が高いと粒子同士が近接する可能性があるため、単独での検出が困難になることが危惧される。以上を踏まえ実験で用いる濃度の溶液を、顕微鏡を用いて観察し、近接していない事を確認して用いる事にした。なお本実験においては、生理食塩水を用いた。

4. 粒子径と散乱光強度の相関

- ① 既知の粒子径を用いた単独マイクロビーズにおける検出信頼性の検討
 - ② 一粒子径での異濃度における散乱光強度ピークの検討
 - ③ 既知の粒子径を用いたマイクロビーズ複数混合下における検出信頼性の検討
 - ④ 経時的な反応に対する検出感度の検討
 - ⑤ ポリスチレンにおける散乱傾向の検討
- 以上5点を検討課題として考えた。

5.1 粒子径と散乱光強度の相関

5.1.1 実験方法

1 μm , 3 μm , 6 μm , 10 μm , 20 μm の粒子径を持つビーズを前述した事を考慮に入れ、濃度調整を行ない、実験試料1種類ずつキュベットに 250 μl 入れて、測定時間 10 分間で実験を行なった。

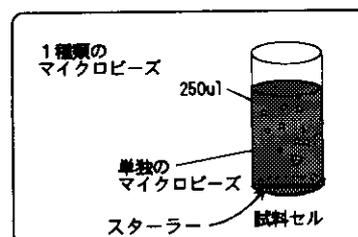
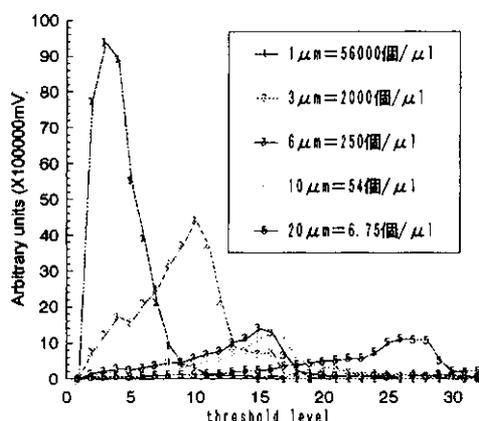


Fig. 1 マイクロビーズ画像



5.1.2 実験結果

Fig. 2 単独ビーズにおける閾値レベルと散乱光強度の関係

縦軸：arbitrary units(mV) 横軸：閾値

このグラフは、32 個存在する閾値間の散乱光強度の総和をプロットしたグラフである。Fig. 2 から分かるように、粒子径に依存した散乱光強度のピークが存在していることが分かる。閾値による散乱光強度ピークの違いは、粒子径が異なる事により検出される散乱光強度が異なる事を示していると言える。以上より単独粒子の検出信頼性が得られたが示された。

5.2 異濃度における粒子径と散乱光強度の相関

5.2.1 実験方法

前述の実験同様であるが、粒子径は変化させず濃度の調整を変えたものをキュベットに 250 μ l 入れて、測定時間 10 分間で実験を行なった。調整した濃度は、粒子径 3 μ m で 30 万個/ μ l・3 万個/ μ l・1 万個/ μ l・5000 個/ μ l・2500 個/ μ l・1250 個/ μ l・625 個/ μ l の 7 種類の濃度である。

5.2.2 実験結果

低濃度領域 2500, 1250, 625 個/ μ l においては、閾値 11 程度のところに強度のピークを示している。しかし、高濃度領域においては、濃度に依存して強度のピークが閾値の大きい方へ変化している傾向が見られた。これらは、Fig.10,11 に示した様に、高濃度においては粒子間が密接していることから、検出の際に複数の粒子からの散乱光を検出している事が疑われる。それゆえに、より大きな粒子からの散乱光強度を検出しているかのように、閾値の大きいところでのピークを示していると考えられる。また低濃度では、顕微鏡での画像を見ても分かる様に、粒子間が密接していないので、単一の粒子により検出され、同一の閾値におけるピークが見られているものと考えられる。

5.3 粒子複数混合下(2 種類)における粒子と散乱光強度との相関

更に同装置での検出信頼性において複数粒子の検出信頼性を検討した。

5.3.1 実験方法

2 種類の粒子径の異なるマイクロビーズを混ぜて、粒子径と散乱光強度の相関を検討した。混合したのは、3 μ m&6 μ m の混合、3 μ m&10 μ m の混合、3 μ m&20 μ m の混合の 3 パターンにおいて混合割合を変えて実験を行なった。

5.3.2 実験結果

Fig.3 は、(3)3 μ m&20 μ m の混合結果を示したものである。2 種類の粒子径に依存した 2 つの総散乱光強度のピークが示されていることが分かる。更にその散乱光強度は混合割合に依存している。以上から、散乱光を用いた凝集能測定装置では、大きさの異なる粒子

の検出が可能であることが確認できた。

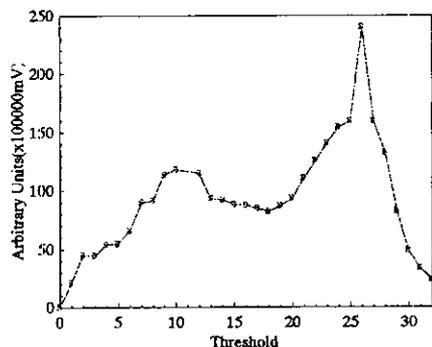


Fig.3 3 μ mと20 μ mを混合した時の総散乱光強度のピーク

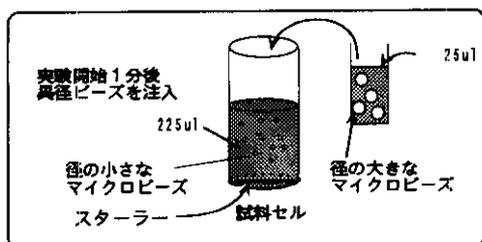
縦軸：arbitrary units(mV) 横軸：閾値

5.4 経時的な反応に対する検出感度の検討

5.4.1 実験方法

実際の凝集能測定では、実験開始1分後に試料中に血小板凝集を惹起する物質を投与するので、惹起物質に対する血小板凝集におけるリアルタイム検出の信頼性を検討した。

そこでまず粒子径3 μ m、濃度2000個/ μ lで試料調整を行なう。そしてキュベットに225 μ l入れ、測定開始1分後に、濃度1000個/ μ lの20 μ mを25 μ l投与してリアルタイムにおける検出感度の検討を行なった。



5.4.2 実験結果

Fig.14 にその結果を示す。Fig.14 から分かるように、異なる粒子径を持つマイクロビーズを投与した直後に散乱光強度が上昇する様子を見て取れるのでリアルタイムにおけ

る検出信頼性を確認することができた。

5.5 ポリスチレンにおける散乱傾向の検討

5.5.1 散乱傾向の検討

血小板とポリスチレンは散乱光強度自体は異なるものの散乱傾向は同様の傾向を示している。

前述した様に、凝集塊の大きさの目安となる閾値は、散乱光強度の常用対数を取った値である。そこで、5.1.2 で得られた単独マイクロビーズにおける散乱光強度のピークを示す閾値から逆に散乱光強度の常用対数をとったものに変換し、その散乱傾向を検討した。以下に示したビーズ粒子径とピークを示す閾値との関係である。そしてその閾値を散乱光強度の常用対数をとったものに変化したものが Fig. 4 である。

Fig.16 ビーズの粒子径と閾値の関係

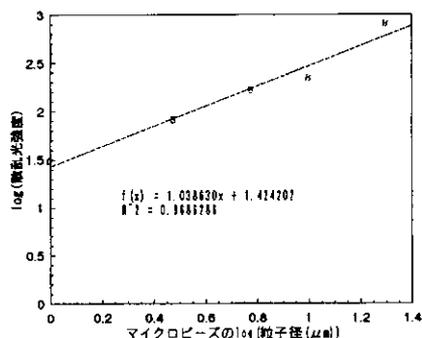


Fig. 4 粒子径と散乱光強度の関係

Fig.17 における粒子径と散乱光強度におけるリニアな関係は、過去の論文(文)における血小板における散乱光強度と同様の散乱傾向を示している。それ故に血小板と同様の散乱傾向を示していることが、この装置を用いて確認することができた。また個の結果により、血小板の代わりとして同装置における相

関実験での使用の有効性を示した事にもなる。

C. 結果

以上の結果をまとめると以下の様にまとめる事ができる。

- ① 同装置を用いた任意の粒子径における単独粒子の検出信頼性を確認することができた。
- ② 同装置を用いた異濃度粒子における単独粒子の検出信頼性を確認することができた。
- ③ 同装置を用いた異なる粒子径を持つ2種類の粒子における検出信頼性を確認することができた。
- ④ 同装置を用いた異物投与におけるリアルタイムでの検出信頼性が確認できた。
- ⑤ 同装置におけるPolystyren Microsphereにおける散乱傾向を確認することができた。

D. 考察

(1)測定領域内に存在する血小板の数

この装置では、測定領域として $20\mu\text{m} \times 60\mu\text{m} \times 140\mu\text{m}$ の長方形を想定している。ここで、血小板濃度が生体内に近い20万~30万個であると設定すると、ガラスキューベット内($250\mu\text{l}$)には、 $250 \times 30 \times 10^4$ 個の血小板が存在することになる。これらの数値より、測定領域内に存在すると考えられる血小板は、34~50個程度であると言える。

(2)測定領域内に存在する凝集塊数

続いて我々は、測定領域内に存在する凝集塊が複数存在する可能性について考えた。

以下の様な濃度 n 、キューベット幅 l 、入射光強度 I_0 、透過光強度 I 、定数 c の状態を考

える。透過光強度 I は Lambert-Beer の法則から

$$I = I_0 10^{-lc n}$$

とおける。これを用いると異なる2種の濃度 n_1, n_2 をふまえて、透過光強度 I_1, I_2 は、

$$I_1 = I_0 10^{-lc n_1}, I_2 = I_0 10^{-lc n_2}$$

とおける。以上から n_2/n_1 を求めれば、凝集率が求められることになる。ここで

$$I_1/I_2 = 10^{-lc(n_1 - n_2)}$$

に $I_1/I_0 = 10^{-lc n_1}$ を式変形した $\log_{10}(I_1/I_0) = -lc n_1$ を代入する。

$$I_1/I_2 = 10^{(n_1 - n_2)(1/n_1) \log_{10}(I_1/I_0)} = 10^{(1 - n_2/n_1) \log_{10}(I_1/I_0)}$$

さらに、

$$\log_{10}(I_1/I_2) = (1 - n_2/n_1) \log_{10}(I_1/I_0)$$

$$\therefore n_2/n_1 = 1 - \log_{10}(I_1/I_2) / \log_{10}(I_1/I_0)$$

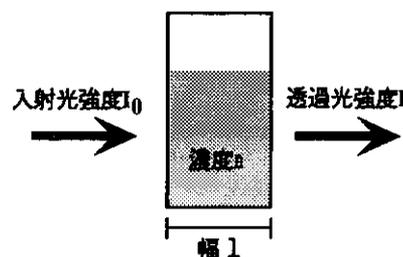


Fig. 5 ガラスキューベットイメージ図

この式により、凝集率が決定できる。例として凝集率 60% の場合を考える。30 万個/ μl の血小板は、18 万個/ μl 分は凝集していることになる。さらに単一血小板 20 個程度で 1 個の凝集塊を形成していると考えたと 18 万個/ μl 程度の濃度が約 1 万個/ μl 程度になっていると考えられる。更には(1)より、測定領域の中には約 34~50 個程度の血小板が存在していると考えられるので、単一血小板 20 個で形成された凝集塊であると仮定すると 2~3 個が確率的には存在することになる。

(3)測定可能な凝集塊の大きさ

同装置は経時的な測定を行っているので、

総散乱光強度は Mie 散乱理論により粒子径の 2~3 乗に比例するだけでなく、粒子の個数にも比例していると考えられる。つまり (粒子径の 2 乗) × (粒子数) に比例する。更に、血小板は、スターラーに攪拌され、その測定領域内の状態は経時的に変化している。ただ、測定領域内に存在する平均の血小板数が約 50 個程度になると考えられるだけである。そこで Poisson 分布に基づく測定粒子個数の揺らぎも考慮する必要がある。(1)より血小板濃度 30 万個/μl において測定領域内には約 50 個の単一血小板が存在すると考えられる。測定領域内血小板数 50、また Mie 散乱理論より血小板の粒子径の 2 乗に比例するものであると仮定する。

Poisson 分布により、測定領域内における粒子の移動は、

$$\sqrt{50} \doteq 7 \text{ 個}$$

の揺らぎがあると考えられる。更に散乱光強度の揺らぎ scatt. は血小板径 d の 2 乗にも比例するので、

$$\text{Scatt.} \propto 7 \times d^2$$

となる。

ここで、(粒子数) × (粒子径の 2 乗) を単一の凝集塊で換算することを考える。凝集塊の径を d_{PLT} と置くと、

$$7 \times d^2 = d_{\text{PLT}}^2$$

$$\therefore \sqrt{7} \times d \doteq \sqrt{7} \times 3 \doteq 8 (\mu\text{m})$$

つまり単一の凝集塊で換算すると 8 μm の凝集塊が揺らぎに相当していると考えられることになる。同装置では、散乱光強度 25mV 以上が血小板 70 個よりなる 9 μm の凝集塊であると定め、測定データの最小値としているので妥当な大きさであると考えられる。以下に示した表は、同装置において評価されている閾値における凝集塊である[10]。

凝集塊の大きさ	S	M	L
閾値	2~21	21~28	28~31
凝集塊の大きさ(μm)	9~26	25~51	50~70
散乱光強度(mV)	25-400	400-1000	1000-2048
凝集血小板数(個)	70-1000	1000-11000	11000-31000

表 1 ヒトに関する閾値の設定

(4)多重散乱における考察

測定領域は、ガラスキューベットの近傍 1mm であるので、イメージとして以下のような円錐内における多重散乱を考えることにする。半径 0.5mm の円を底面に持つ高さ 1mm の円錐を仮定した。円錐の体積は、

$$(\pi \times 0.5^2) / 3 \text{ mm}^3 \doteq 0.262 \text{ mm}^3 = 0.262 \mu\text{l}$$

であるから、濃度 30 万個/μl において円錐内に存在する血小板数は、

$$0.262 \times 30 \times 10^4 = 7.86 \times 10^4 (\text{個})$$

である。ここで、血小板 1 個あたりの断面積は、血小板の径を 3 μm とすると

$$(3/2)^2 \pi \doteq 7.07 (\mu\text{m}^2)$$

以上より血小板により作られる多重散乱により占められる面積は、

$$7.86 \times 10^4 \times 7.07 \doteq 55.8 \times 10^4 (\mu\text{m}^2) = 0.558 \text{ mm}^2$$

この面積を円で近似すると、直径 R は、

$$0.558 = (\pi R^2) / 4$$

$$\therefore R = 0.842$$

つまり底面の 84.2% が多重散乱の影響を受けることになる。しかし、この状態は確率的に起こりうる最も多重散乱の影響を受ける状態である。さらにこの影響を受ける領域は、血小板の凝集率に伴い低下するので、実際の実験では、より多重散乱の影響が軽減されているものと考えられる。

F. 健康被害情報 無

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Microvascular Research 61(3):231-239,2001
- ② Physiological Measurement, 21(4), pp 459-71, 2000.
- ③ Microcirculation annual 2001 Nihon-Igakukan, Tokyo, p93- - 98, 2001,
- ④ Microcirculation annual Nihon-Igakukan, Tokyo, pp129-130, 2001, August
- ⑤ 静脈学 12(3):39-48, 2001
- ⑥ 電気学会論文誌 (電子・情報・システム部門誌) Vol. 121-C, No. 9, pp. 1415-21, 2001.

2. 学会発表

- ①第 27 回日本微小循環学会 平成 14 年 2 月, 5 演題
- ②第 24 回日本止血血栓学会 平成 13 年 1 1 月

H.知的財産権の出願 無

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)

分担研究報告書

炎症、免疫応答に於ける IL-1 の役割

分担研究者 岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター教授

研究要旨

我々が発生工学手法を用いて独自に開発した関節リウマチモデルを用いて、関節炎発症に於ける IL-1 の役割について検討した。HTLV-I トランスジェニックマウスにおいては関節で IL-1 や TNF- α 、IL-6 など種々の炎症性サイトカインの発現が亢進しているが、このうち、IL-1、あるいは IL-6 を欠損させたときのみ、発症が強く抑制された。また、IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) 欠損マウスは自己免疫性の関節炎を自然発症することを先に報告したが、この発症は TNF- α を欠損させることにより、完全に抑制できることがわかった。また、IL-1 には免疫系を活性化作用のあることを示し、これは T 細胞上に CD40L や OX40 などの副シグナル伝達分子の発現を誘導するためであることがわかった。

A. 研究目的

我々は先に HTLV-I の tax 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (HTLV-I Tg マウス) を作製し、このウイルスがヒトの慢性関節リウマチによく似た慢性関節炎を引き起こすことを示した。これまでの解析から、このマウスの関節炎の発症には T 細胞に依存した自己免疫が関与することを明らかにした。関節で IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が亢進していたことから、これらのサイトカインの病態形成に於ける役割を明らかにするために、これらのサイトカインを欠損した HTLV-I Tg マウスを作製し、病態形成に及ぼす影響を検討した。またこれに関連して、IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) ノックアウト (KO) マウスを作製し、このマウスが自己免疫性の関節炎を発症することから、少なくとも IL-1 シグナルの異常によって自己免疫が引き起こされること

を示した。これらの事実はサイトカインが自己免疫性慢性関節炎の発症に深く関与していることを示している。本研究では、自己免疫発症に於ける IL-1 の果たす役割、および関節炎発症に於ける種々のサイトカインの役割について検討した。

B. 方法

HTLV-I Tg マウス: HTLV-I の LTR-env-pX-LTR 領域を導入したものを使用した。
IL-1Ra KO マウス: IL-1Ra KO マウスは、エクソン 1-4 をネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより作製した。これらのマウスはいずれも BALB/cA マウスに 8 世代以上戻し交配し、実験に供した。

C. 結果

1. IL-1KO マウスは SRBC に対する免疫応答が低下しており、逆に IL-1RaKO マウ

スは亢進していた。DO11.10Tg マウスと IL-1KO マウスとを掛け合わせ、免疫応答における IL-1 の役割を検討したところ、T細胞、B細胞、抗原提示細胞(APC)それぞれの機能は正常であるにもかかわらず、T細胞と APC との相互作用がうまく機能していないことがわかった。そこで、T-APC 相互作用に関与する CD40 リガンド(L)や OX40 などの発現を検討したところ、IL-1 欠損マウスでは発現が誘導されおらず、IL-1 がこれらの副シグナル伝達分子の発現を制御していることがわかった。実際、培養T細胞を組換え IL-1 で処理したところ、これらの分子が誘導されることがわかった。また、IL-1 欠損マウスを抗 CD40 抗体で処理したところ、SRBC に対する抗体産生が正常化することがわかった。

2. HTLV-I Tg マウスでT細胞上の CD40L や OX40 の発現を調べたところ、15 倍以上亢進していた。一方、IL-1 欠損 HTLV-I Tg においては野生型マウスと同じレベルであることがわかった。また、IL-1Ra KO マウスに抗 CD40L、あるいは抗 OX40L 抗体を投与したところ、関節炎の発症が抑制されることがわかった。これらの結果は、IL-1 による、CD40L、あるいは OX40 の誘導が自己免疫発症に重要な役割を果たしていることを示している。
3. HTLV-I Tg マウスの IL-1、あるいは IL-6 を欠損させると関節炎の発症が抑制されることがわかった。このとき、TNF- α を欠損させても発症には全く影響を与えないことがわかった。IL-1、あるいは IL-6 欠損により、CD40L、および OX40 などの T細胞上の副シグナル分子の発現は強

く抑制されることがわかった。この結果、T細胞は自己抗原に対する増殖応答性が著しく低下していた。さらに、IL-1Ra KO マウスでサイトカイン欠損の影響を検討したところ、TNF- α の欠損により、発症が完全に押さえられることがわかった。逆に、IL-6 を欠損させても発症に全く影響を与えないことがわかった。

D. 考察・結論

以上の結果は、APCにより産生された IL-1 はT細胞表面に CD40L や OX40 などを誘導し、T-APC、あるいは、T-B 相互作用を促進することがわかった。IL-1Ra KO マウスでは T細胞上の IL-1Ra がいないために、APC からの IL-1 シグナルが過剰にT細胞を活性化し、その結果自己免疫性の関節炎を発症するものと考えられる。この結果、IL-1Ra は免疫系のホメオスタシスの維持にきわめて重要な役割を果たしていることがわかった。また、IL-1 シグナルの抑制と共に、OX40 や CD40 シグナルの抑制が関節炎治療に有効であることが示唆された。さらに、HTLV-I Tg マウスモデルと IL-1Ra KO マウスモデルでは関節炎発症に於いて主役を演じるサイトカインが全く異なることが示され、ヒトでも病因により関与するサイトカインが異なる可能性が示唆された。また、病態形成に於ける、TNF- α と IL-6 の排他的、相補的な役割が示唆された。現在、IL-1Ra KO マウスに見られる血管炎についても、病態形成に於ける免疫学的機序の関与について検討している。

E. 研究発表

Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y.,

- Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. Requirement for NKT cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, **98**, 2577-2581 (2001).
- Nakae, S., Asano, M., Horai, R., Sakaguchi, N., and Iwakura, Y. IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40L and OX40 on T cells. *J. Immunol.*, **167**, 90-97 (2001).
- Nakae, S., Naruse-Nakajima, C., Sudo, K., Horai, R., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1 α , but not IL-1 β , is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity. *Int. Immunol.*, **13**, 1471-1478 (2001).
- Nakae, S., Asano, M., Horai, R., and Iwakura, Y. Interleukin-1 β , but not interleukin-1 α , is required for T cell-dependent antibody production. *Immunology*, **104**, 402-409 (2001).
- Saijo, S., Asano, M., Horai, R., Yamamoto, H., and Iwakura, Y. Suppression of autoimmune arthritis in IL-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40L and OX40 expression on T cells. *Arth. Rheum.*, **46**, 533-544 (2002).
- Kakuta, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Nanno, M., and Iwakura, Y. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon- γ through direct inhibition of cell proliferation and activation of anti-tumor host mechanisms. *Immunology*, **105**, 92-100 (2002).

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

血管炎病態に関与する好中球機能

動物モデルを用いた解析

分担者：鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長
分担者：山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部主任研究官

研究要旨：多臓器不全の要因には、肝臓など重要臓器の傷害や心血管系と血球成分の反応、とりわけ好中球の活性化状態が重要であると想定される。そこで、本研究では、血管炎の発症に関連する好中球機能、myeloperoxidase(MPO)の性状、血清中の好中球抗体MPO-ANCA値について血管炎モデルマウスを用いて解析した。腎炎や血管炎発症モデルマウスは、自然発症のNZB/WF1、MRL、SCG、IRF-8/ICSBPマウスおよび*Candida albicans*-derived substances (CADS)誘発冠状動脈炎マウスを用いて解析した。また、血管炎にMPOおよびMPO-ANCAの関与は、われわれのグループで作製したMPO遺伝子欠損マウスを用いて解析した。その結果、MPOがMPO-ANCA産生の主要な抗原の一つになり、MPO-ANCAが血管炎進行に関与することを明らかにした。また、好中球異常を示す転写因子IRF-8/ICSBPの欠損マウスにおいて、好中球異常がMPO-ANCA産生に関与することを認め、MPO-ANCAは加齢とともに上昇することが判明した。一方、血管炎、腎炎の発症への好中球の関与を明らかにする目的で、半月体形成性系球体腎炎を高率かつ急速に自然発症するSCG/Kjマウスを用い解析し、腎炎の発症、進行の初期段階（尿たんぱく300mg/dl以下）の末梢好中球が無刺激でMPOの易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。一方、LECT2は、肝細胞で高発現し肝炎などの肝細胞障害によりそのmRNA発現が低下した。現在、LECT2の機能解析が進行しており、LECT2は、血管炎にともなう多臓器不全の機構解析に有用な因子となると推定される。

本研究は、大川原明子（国立感染症研）、橋本ゆき（同）、松岡俊行（同）、斎藤武（同）、亀岡洋祐（同）倉文明（同）、渡辺治雄（同）、Keiko Ozato(NIH-USA)、直江史郎（東邦大・医・大橋病院）、高橋啓（同）、大原関利章（同）、荒谷康昭（横浜市大・木原研）、小山秀機（同）、岡崎富男（広島市民病院）、武曾恵理（北野病院）、猪原登志子（京都大学院医）、小野孝彦（同）、大野尚仁（東京薬大）、三浦典子（同）、新井孝夫（東京理科大）、Nobuyo Maeda（ノースカロライナ大）の各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

多臓器不全の要因には、肝臓など重要臓器の傷害や心血管系と血球成分の反応、とりわけ好中球の活性化状態が重要であると想定される。そこで、本分担研究では、劇症化機転・修飾にかかわる炎症細胞の血管炎の病態との関連について解析するこ

とを目的とした。

血管炎の病態には炎症細胞が関与していることが病理所見から観察されている。Microscopic polyangiitis (MPA)などの顕微鏡所見では多くの好中球浸潤が認められることがある。しかし、これらの細胞がどのように血管炎の発症や病態に関与し

ているかについては、ほとんど推定の範囲を越えていない。血管炎の組織観察される、マイクロファージ、好中球、リンパ球の炎症細胞は、本来、外来異物などを排除する生体防御機能として作用するが、一方で、血管傷害もひきおこしていると推定されている。また、血管炎患者には血清中に好中球抗体 ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody)が上昇することや、好中球抗体と好中球が血管炎に関与していることが明らかになってきている。したがって、好中球がその抗体 ANCA とともに血管炎に関与していることが容易に想像できるようになってきた。

これまで、血管炎の病因がかかわるリスク因子としては、上記の ANCA および、それ以外の自己抗体、IL-8 や TNF α などの炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化、接着分子、内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などがあり、それらの因子がトリガーとして連鎖していると推定されている。一方、血管炎の患者の血中には、高い MPO の酵素活性とともに、活性化された好中球が血液中を循環していることが明らかになっている。その活性化好中球が、血管炎の発症と病態の進行に関与していると推定されている。この時、好中球は、Fc γ レセプターを介して活性化されていることが示されており、Fc γ レセプターが関与して自己抗体 MPO-ANCA 抗体が好中球を活性化しているのではないかと推定されている。この様にして、生体側に不利な細胞傷害を引き起こす好中球の活性化には、その抗体 ANCA が深く関わっていることが報告され、特に、MPO-ANCA の関与についての解析が進

んでいる。

MPO-ANCA が疾患誘導にかかわっていることが推定されているが、MPO-ANCA の抗体価は、必ずしも疾患の病態と連動していないことがわかってきており、病態と密接に関与する MPO-ANCA について検討することが重要である。このため、我々は、血管炎の病態を判定するための MPO-ANCA エピトープ解析用パネルを作製して、解析した結果、MPO-ANCA のクロナリティは、血管炎疾患および病態と関連があることを示唆した。

一方、血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。腎炎や血管炎を有する NZB/WF1、MRL、SCG、IRF-8/ICSBP マウスや *Candida albicans* - derived substances (CADS)誘導の冠状動脈血管炎マウスなど血管炎モデルマウスを用いて血管炎発症に関与する MPO-ANCA や好中球機能について解明する必要がある。そこで、これまで検討してきた CADS の接種によって誘発される冠状動脈炎を発症するモデルマウスで、血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べた。さらに、CADS 誘導の血管炎に高値に認められる MPO-ANCA の抗原が MPO であるかや血管炎発症に MPO および MPO-ANCA が関与しているかを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種することで検討した。また、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用い、腎炎の発症、進行への好中球機能および MPO-ANCA の関与について解析した。さらに、好中球異常を示す転写因子 IRF-8/ICSBP の欠損マウ

スでの好中球異常が MPO-ANCA 産生に関与するかを検討した。

B. 研究方法

1) 血管炎モデルマウス

1-1) CADS 誘導の冠状動脈血管炎マウス：4 週齢オス C3H/HeN マウスに 5 週齢と 9 週齢に CADS を 5 日連投した。

1-2) 半月体形成性糸球体腎炎発症の SCG/Kj マウス：20 週齢までの本マウスの尿たんぱく質を検出し 0 mg/dl (腎炎発症前)、300 mg/dl 以下 (腎炎初期段階)、それ以上 (腎炎後期段階) に分け、血清 MPO-ANCA 値、好中球機能を解析した。

1-3) 好中球機能分化異常を示す ICSBP-KO マウス：48 週齢までの血清中 MPO-ANCA 抗 DNA 抗体を測定した。また、好中球機能は、16 週齢オスマウスの脾臓および末梢血から好中球を分離した。バックグラウンドには C57BL/6 を使用した。

2) 尿たんぱく質検出

SCG/Kj において腎炎発症と病期を尿たんぱく質検出により判定した。尿生化学検査用スティックで尿たんぱく、潜血を経時的に測定し腎炎の発症、病態の指標とした。

3) 好中球の分離

3-1) SCG/Kj マウス：雌 SCG/Kj マウス、C57BL/6 マウス (コントロール) の腹部大動脈よりヘパリン採血し、比重法によって抹消好中球画分を単離した。

3-2) ICSBP-KO マウス：抗 Gr-1 抗体 (granulocyte differentiation marker) と Magnetic cell sorting system(MACS)を

用いて、末梢血および脾臓よりそれぞれ分離した。

4) 好中球機能解析

4-1) MPO 放出活性：終濃度 10^{-5} M の FMLP および $5 \mu\text{g/ml}$ の サイトカラシン B で好中球を刺激して脱顆粒し、 H_2O_2 を基質として細胞外への MPO 放出率を求めた。

4-2) 活性酸素産生：活性酸素産生は、チトクローム c の還元能により求めた。

5) マウスのリコンビナント MPO の調整
マウスのリコンビナント MPO は、ヒトのリコンビナント MPO と同様に作製した。

6) マウス血清中の MPO-ANCA 値

ヒトおよびマウス MPO の ELISA により測定した。ヒト MPO はヒト MPO-III を抗原とした。マウス MPO は、rmMPO を使用した。

7) 血管炎発症の検討

屠殺後、病理標本作製し血管炎の評価をした。

8) ICSBP-KO マウス脾臓好中球の形態観察

脾臓より分離した好中球を 0.001% BSA 存在下で 15 分間、 37°C で加温し、スライドガラスに接着させた後、Peroxidase activity stain を行い、1% サフラニンで後染色し、好中球を同定し細胞形態を観察した。

9) ADVIA による ICSBP-KO マウス脾臓

好中球の細胞あたりの MPO 値の測定
血球のプロファイルおよび細胞あたりの
MPO 活性を算出するために、ADVIA を
用いて解析した。

C. 研究結果

1) CADS 誘導の冠状動脈血管炎に伴い
MPO-ANCA 値は、MPO-KO マウスでは、
野生型マウスに比べ抑制された。CADS 誘
導の血管炎発症率と血清中の MPO-
ANCA 値について野生型のそれと比較し
た結果、血管炎の発症率は、MPO-KO 群
では 40%と対照群 100%より激減した。一
方、血清 MPO-ANCA 値は MPO-KO 群で
は、ワイルド対照群と比較して有意に抑制
されていた (表 1)。

CA Mouse	N	MPO-ANCA		anti-dsDNA (%)
		(hEU/ml)	(IU/ml)	
C57BL/6	4	11.1 ± 6.0	37.1 ± 33.5	
MPO-KO	5	4.8 ± 2.2	22.3 ± 3.8	
PBS (-) injection C57BL/6	10	3.5 ± 4.5	23.4 ± 8.4	

表 1. MPO-KO 群とワイルド対照群にお
ける冠状動脈炎発症、MPO-ANCA および
抗 DNA 抗体値

2) MPO-KO マウスでは CADS 誘導の冠
状動脈血管炎が激減した。CADS 誘導の冠
状動脈血管炎に伴い MPO-ANCA は、
MPO-KO マウスでは、野生型マウス比し
著しく抑制された。MPO-KO マウスでは
CADS 誘導の冠状動脈血管炎が激減した

(表 1)。また、抗 DNA 抗体値は、
MPO-KO 群とワイルド対照群では差がな
かった (表 1)。

4) SCG/Kj マウスによる糸球体腎炎の発
症と進行における活性化好中球の役割の
解析

腎炎の発症、進行のすべての時期を通じ
て FMLP 誘導の MPO 放出が亢進し、差
が見られなかったが、無刺激の好中球から
の MPO 放出は、尿たんぱく 300mg/dl 以
下の腎炎発症初期で高値を示し MPO の易
放出性を示した (図 1)。一方、同時期の
好中球活性酸素産生能、血清中 MPO-
ANCA 値はむしろ低値であった。さらに、
ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を
阻害するアセアノスタチンをマウスの好
中球に作用させたところ無刺激好中球の
MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治
療薬の開発に応用できる可能性が示唆さ
れた。また、抹消血中の好中球数の有意の
増加が認められた。さらに、腎臓障害にお
いて好中球浸潤、無刺激 MPO 放出が有意
に相関した。

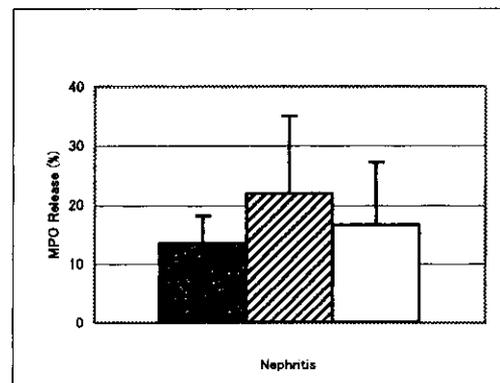


図 1. SCG/Kj マウスの好中球無刺激 MPO
放出活性